

マウス神経細胞におけるアポトーシス誘導膜蛋白 Fas の発現

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

朴 在 鎬

Fas 抗原はアポトーシス誘導活性を有する細胞表面膜蛋白であり、胸腺、肝臓、肺、卵巣、心臓等の臓器でその発現が確認されている。中枢神経系においては現在までに神経膠腫において Fas の発現が確認されており、実際に培養神経膠腫細胞においては抗 Fas 抗体によりアポトーシスが誘導されることが報告されている。しかし、神経細胞における Fas の発現および抗 Fas 抗体の神経細胞に対する影響に関しては現在なお不明である。本研究では Balb/c マウス脳における Fas の発現に関して、蛋白および mRNA に注目して検索した。逆転写 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) による検索では、Fas mRNA は大脳、小脳、海馬に存在した。免疫組織化学的検索では Fas は海馬の CA2 と CA3 および大脳皮質第Ⅲ層の錐体細胞に発現していたが、小脳では発現は確認されなかった。さらに、全海馬および大脳の細胞を培養し未固定の状態で免疫染色後、フローサイトメーターで検索したところ、海馬は Fas 陽性の神経細胞が相当数、大脳には少数存在していた。以上より、神経細胞の一部に Fas が発現することが確認され、これにより中枢神経系における神経細胞死に Fas が関与する可能性が示唆された。

Key words anti-Fas antibody, apoptosis, Balb/c mouse, Fas antigen, neuron

いわゆる細胞死は壊死とアポトーシスに大別される¹²⁾。壊死は種々の原因によって惹起される受動的な細胞死であるのに対し、アポトーシスは生体にとって不必要な細胞が合目的に排除される際に誘導される生理的細胞死と考えられている³⁾。アポトーシスは核クロマチンの凝縮、核および細胞質の濃縮、断片化などの形態学的特徴や、DNA に180-200塩基対 (base pair, bp) の整数倍でオリゴヌクレオソーム単位の断片化がおけるといった生化学的特徴から壊死とは明確に区別される¹⁾。1972年にはじめて報告されて以来、免疫系、血液系、神経系において多くの研究がなされ、アポトーシスは生体の恒常性維持に重要な役割を果たすことが知られている^{5)~8)}。

Yonehara らは1989年にこのアポトーシス誘導活性を有する細胞表面膜タンパク質に対するモノクローナル抗体である抗 Fas 抗体を作製した⁹⁾。この抗 Fas 抗体により認識される Fas 抗原は、319個のアミノ酸からなり1つの細胞膜貫通部分を有するI型の膜蛋白である。その細胞外ドメインはシステイン残基に富み、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) のレセプターや神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) の低親和性レセプターと相同性を有し、TNF/NGF レセプタースーパーファミリーに属する。Fas 抗原は胸腺や、肝臓、肺、卵巣、心臓等の臓器で強く発現していることが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。Fas cDNA をマウス T リンパ腫細胞に導入し、Fas 抗原を強く発現させると抗 Fas 抗体でアポトーシスが誘導されることから、Fas 抗原がアポトーシスのシグナルを細胞内に伝えていることが明らかになった¹²⁾。また、細胞障害性 T 細胞から Fas リ

ガンドの cDNA クローニングが行われ、生体内には、Fas 抗原に対する Fas リガンドが存在し、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった^{13)~15)}。

脳神経領域では神経膠腫において Fas 抗原の発現が確認されており、実際にある種の培養神経膠腫細胞においては抗 Fas 抗体によりアポトーシスが誘導されることが報告されている^{16)~18)}。さらに、脳腫瘍組織においては Fas の発現とアポトーシスの頻度とが相関していることより、抗 Fas 抗体または Fas リガンドにより腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することで、神経膠腫を治療する可能性が論じられている¹⁹⁾。

しかし、マウスに抗 Fas 抗体を腹腔内投与すると激症肝炎が誘発される²⁰⁾ように、抗 Fas 抗体が抗腫瘍効果を持つとしても、同時に神経細胞毒性をきたすという懸念がある。現在までに正常神経細胞では Fas の発現は確認されておらず²¹⁾、また抗 Fas 抗体や、Fas リガンドの正常神経細胞に対する影響は不明である。

このような背景より、本研究では中枢神経細胞における Fas の発現の有無を蛋白および mRNA レベルから検討した。

対象および方法

1. 実験動物

実験動物は生後15日の Balb/c マウスおよび MRL lpr/lpr マウスを用いた。MRL lpr/lpr マウスは、リンパ節に特殊な T 細胞の蓄積や自己抗体の産生により、糸球体腎炎や全身エリテマトーデス様の自己免疫疾患をきたし、約5ヵ月齢で死亡する²²⁾。

平成7年12月15日受付, 平成8年2月13日受理

Abbreviations: bp, base pair; CA, cornu Ammonis; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; MAP, microtubule-associated protein; NGF, nerve growth factor; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TNF, tumor necrosis factor

Table 1. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction (PCR) for Fas DNA

Primer	Location of Fas gene	Sequences (5'-3')
1	27-46	CGCTGTTTTCCCTTGCTGCA
2	1029-1049	ACTGAGGTAGTTTTCACTCCA

The length of PCR product with these primers is 1023 base pairs.

Table 2. Oligonucleotide primers for PCR for β -tubulin DNA

Primer	Sequences (5'-3')
A	TGTGGCAACCAGATCGGTGCT
B	AGCCTCGGTGAACCTCCATCTC

The length of PCR product with these primers is 1200 base pairs.

これは、Fas 遺伝子の第2イントロンにトランスポゾン (transposon) の挿入があるために機能的な Fas mRNA の発現がほとんど認められないためと考えられている²³⁾。また神経細胞初代培養に際しては生後1日の Balb/c マウスを用いた。

II. 免疫組織化学的検索

生後15日の Balb/c マウスをジエチルエーテル麻酔下にて断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は直ちに4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、電子レンジによるマイクロウェーブを20秒間、3回照射した後、4℃で6時間浸漬固定を行った。ポリエステルワックス (BDH Laboratory Supplies, Poole, England) に包埋した後、厚さ5 μ mの全脳連続切片を作成し3-アミノプロピルトリエトキシシラン (Aldrich, Milwaukee, USA) を塗付したスライドグラスに貼付した。一次抗体は、ラット抗マウス Fas 抗体である RMF9 (京都大学ウィルス研究所、米原 伸教授より供与) を20 μ g/mlの濃度で4℃にて一晩反応させた。対照としては、4%パラホルムアルデヒド固定した免疫染色には適さないことがフローサイトメーターによる検索で確認されているラット抗マウス Fas 抗体、RMF6 (京都大学ウィルス研究所、米原 伸教授より供与) を同様に使用した。RMF9, RMF6 いずれも20 μ g/mlの濃度で使用し、抗体と組織切片を4℃にて一晩反応させた。二次抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 標識ヤギ抗ラット Ig's (G+L) 抗体を1時間反応させた。最後に3,3'-ジアミノベンジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (PIERCE, Illinois, USA) にて抗体の可視化を行い、光学顕微鏡にて観察した。

III. 逆転写 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法

1. 脳組織の摘出

生後15日の Balb/c マウスよりジエチルエーテル麻酔下にて大脳と海馬、小脳を摘出した後、迅速に細かく破碎し、液体窒素にて急速凍結し-80℃に保存した。陰性対照としては、MRL lpr/lpr マウスの脳組織を用いた。

2. 総 RNA の抽出

ISOGEN (ニッポンジーン、富山) の総 RNA 単離試薬を用いて凍結保存したマウス脳組織より総 RNA の抽出を行った。すなわち、組織100mgあたり1mlの割合で ISOGEN を加え5分間静置した後、クロロホルム (和光、京都) を組織100mg あ

たり0.2mlの割合で加えて混和し、4℃、10000rpm、20分間遠心した。RNAを含む水層を別容器に移しイソプロパノール0.5mlを加え混和後、4℃、10000rpm、20分間遠心したのちイソプロパノールを除去した。最後に75%エタノールを1ml加え、4℃、7500rpm、5分間遠心した後、エタノールを乾燥させ、沈澱した RNA をエリウシオン緩衝液 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 100 μ lに溶解して、260nmの吸光度を測定し総 RNA 濃度を測定した。

3. cDNA 合成

抽出した RNA を鋳型として cDNA 合成を行った。すなわち、RNA 3 μ g を70℃で10分間変性させた後、20mM Tris-HCl, pH8.4, および50mM 塩化カリウム (KCl), 2.5mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 0.5mM デオキシリボスクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), 10mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 500ng オリゴ (dT)₁₂₋₁₈, 200単位 スーパースクリプト (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) 20 μ lの混合液の中で42℃にて50分逆転写反応を行い cDNA を作成した。

4. PCR 反応

上記の試料3mlを鋳型としPCR法にてマウス Fas 遺伝子断片の増幅を行った。表1、表2に示すようなプライマーとPCR反応緩衝液、デオキシリボスクレオチド混合液 [dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各500 μ M (GIBCO BRL)], およびTaq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5単位を用いPCR反応を行った。蒸発防止のため30 μ lのミネラルオイル (Sigma, St. Louis, USA) を重層した。反応にはDNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer) を使用し、熱変性を94℃、1分間、アニーリングを57℃、1分間、DNAの伸長を72℃、2分30秒間行うのを1サイクルとして、30サイクル繰り返した。反応終了後、DNA溶液10 μ lを1 μ gのエチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を加えた1%アガロースゲル (Sigma) に100Vの定電圧で電気泳動した。DNAサイズマーカーとしては、 Φ 174/Hae ダイジェスト (New England Biolabs, Beverly, USA) を用いた。紫外線照射により増幅されたDNA断片の検出を行った。

IV. 免疫細胞化学的検索

1. 神経細胞初代培養

生後1日の Balb/c マウス脳より海馬および大脳皮質を分離し、酵素処理および機械的処理により分散した。ポリエチレニンでコートしたチャンバースライド (Nunc, Naperville, USA) と6穴ディッシュ (岩城ガラス、東京) 上に2 \times 10⁵/cm²の密度となるように播種した。これらの細胞を5%牛胎仔血清 (fetal calf serum, FCS) (Equitech-Bio, Ingram, USA) 加ダルベッコ変法イーグル/F12培地 (Dulbecco modified Eagle's medium/F12, DMEM/F12) (GIBCO BRL) にて37℃、5% CO₂存在下で培養した。培養48時間後に培地をN₂サプリメント

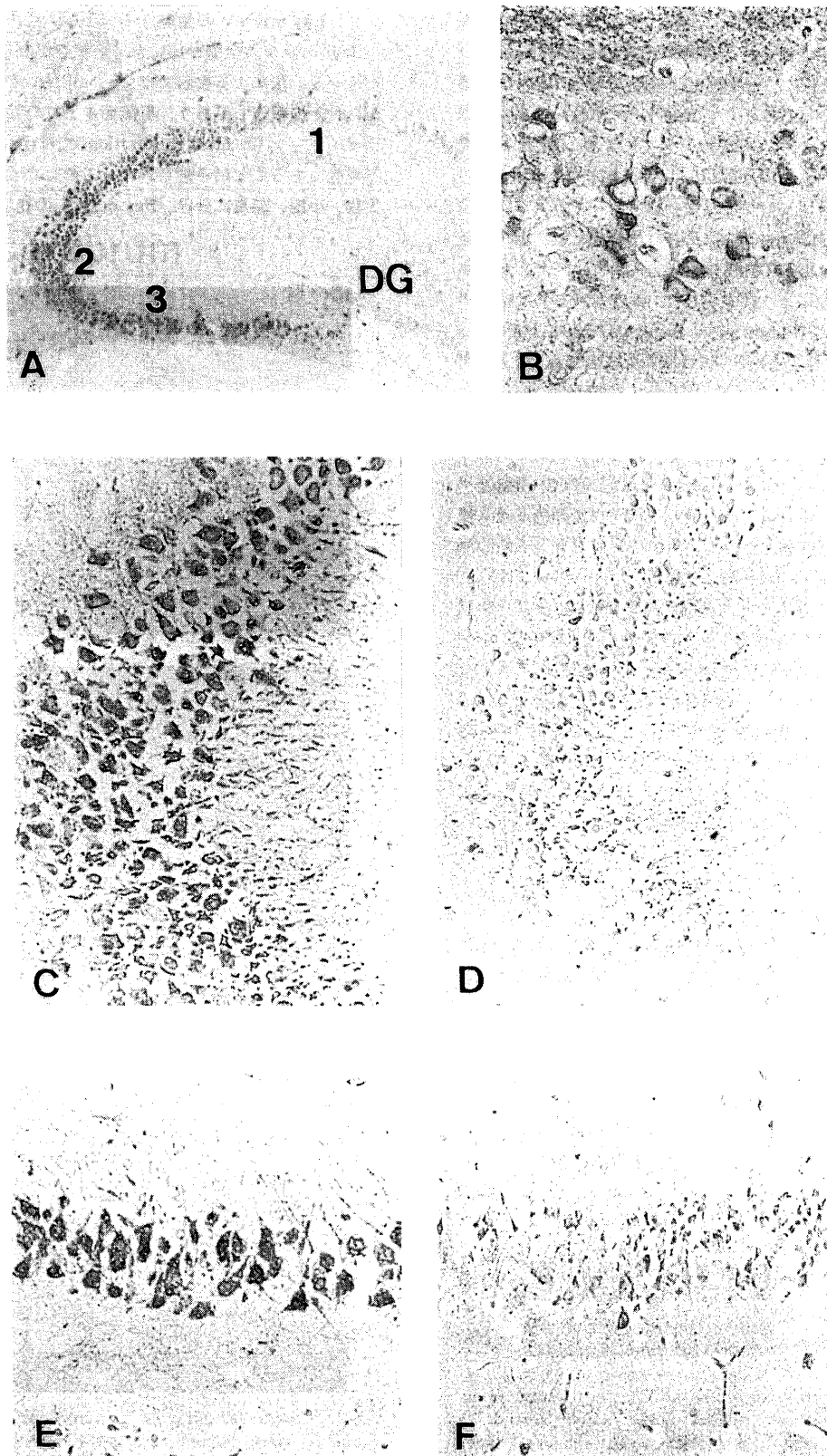


Fig.1. Immunohistochemical staining of Balb/c mouse brain using an antibody against Fas antigen. (A) Hippocampus ($\times 40$). (B) Cortical III layer of cerebrum ($\times 200$). (C) and (D) CA3 sector of hippocampus ($\times 200$). (E) and (F) CA2 sector of hippocampus ($\times 200$). (A), (B), (C) and (E). Immunostained with anti-Fas antibody, RMF9. (D) and (F). Immunostained with control antibody, RMF6. 1, CA 1; 2, CA 2; 3, CA 3; DG, dentate gyrus.

(GIBCO BRL) を添加した無血清培地と交換した。

2. 免疫染色

培養6日目にチャンバースライドの培養液を除去した後、リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) にて洗浄し、Fas 染色と微小管結合タンパク質 (microtubule-associated protein, MAP)-2 染色の二重染色を行った。Fas 染色では標本を未固定のまま一次抗体として RMF9 を 20 μ g/ml の濃度で 20 $^{\circ}$ C, 30分間作用させ、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ラット Ig's (G+L) 抗体 (Ceder Lane, Ontario, USA) を 20 $^{\circ}$ C, 15分間作用させた後streptavidin-ローダミンコンジュゲイト (Serotec, Kidlington, England) にて発色した。陽性対照としては、Fas を NIH-3T3 細胞にトランスフェクションさせた細胞を用いて上記のように染色した。陰性対照としては、一次抗体にラット IgG (Pharmingen, Sandiego, USA) を用いた。その後、これを0.1%トライトン X (東京化成工業, 東京) を加えた4%パラフォルムアルデヒドにて10分間固定し、抗MAP-2 抗体 (Leinco, Wanchester, England) 10 μ g/ml を室温にて30分間作用させた。最後に二次抗体であるフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Cappel, Darham, USA) にて発色した。蛍光顕微鏡にてこれを観察した。

3. フローサイトメーターによる解析

ディッシュに 5mM EDTA を 5分間作用させた後、ラバーを用いて培養細胞を剥離した。EDTA を洗い流し、5% FCS を含んだ PBS に浮遊させ、96穴ディッシュ (岩城ガラス) に 1 \times 10⁵/cm² の密度で播種し、RMF9 を用いて染色を行った。二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ラット Ig's (H+L) 抗体 (Ceder Lane) を作用させ発色した。染色した試料を Epics Elite (Coulter, Miami, USA) にて測定した。陰性対照としては、2. と同様に一次抗体にラット IgG (Pharmingen) を用いた。

成 績

1. マウス脳における Fas 蛋白の発現

Balb/c マウスにおいては Fas 蛋白の発現が海馬において観察された (図 1A)。海馬 CA2 と CA3 においてはほとんどの細胞の細胞膜に Fas の強い発現が認められた (図 1A, C, E)。

しかし、海馬の他の領域である CA1 や歯状回 (dentate gyrus, DG) においては発現は認められなかった (図 1A)。大脳においても皮質第Ⅲ層の錐体細胞に Fas 蛋白陽性の神経細胞

が認められた (図 1B)。しかしその数は海馬に比し少なかった。小脳においては免疫組織化学的に Fas 蛋白の発現を確認し得なかった。

II. Fas mRNA の発現

Balb/c マウス全脳を用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション法による検討では Fas mRNA の発現は確認し得なかったとの報告¹¹⁾があり、組織切片上での固定細胞ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) では Fas mRNA の同定は不可能であることが予想された。このため Balb/c マウス脳を大脳、小脳、海馬に分け、Fas mRNA の発現を RT-PCR によ



Fig. 2. RT-PCR analysis of Fas mRNA from mouse brain. The mouse β -tubulin mRNA (base pairs) served as internal control. lane 1, molecular weight makers. lanes 2-5 show Balb/c mouse material: lane 2, cerebrum; lane 3, cerebellum; lane 4, hippocampus; lane 5, thymus of Balb/c mouse as positive control. lanes 6-9 show MRL lpr/lpr mouse material: lane 6, cerebrum; lane 7, cerebellum; lane 8, hippocampus; lane 9, thymus as negative control.

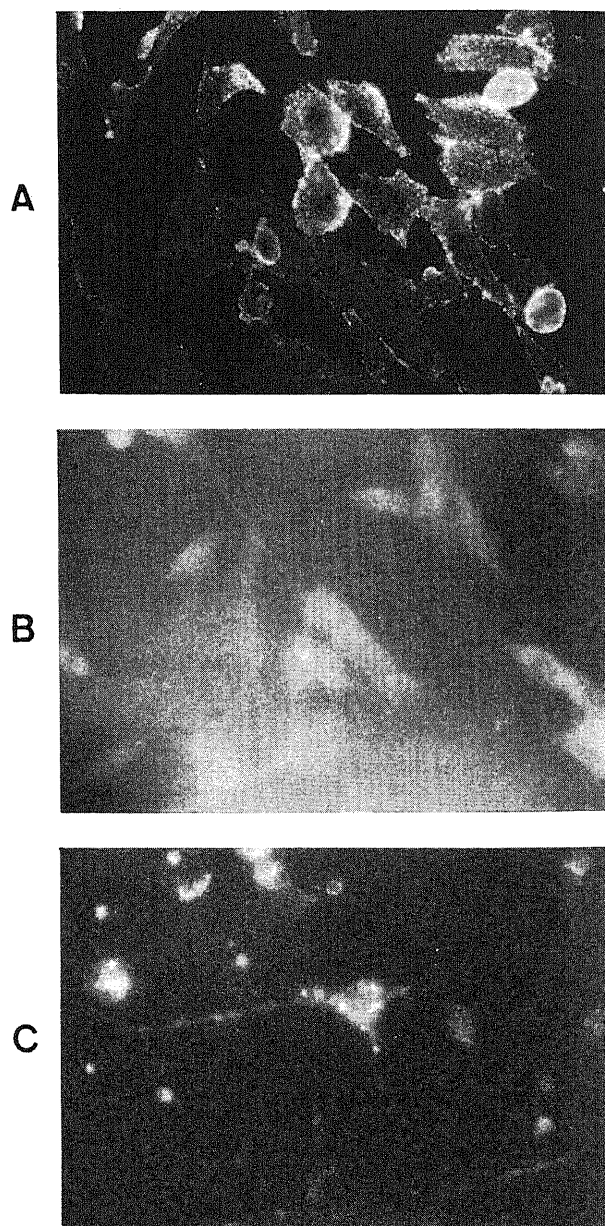


Fig. 3. Immunostaining of cultured cells. Cells without fixation were stained with anti-Fas antibody, RMF 9 and biotin goat anti-rat Ig (H+L) antibody and then treated with rhodamine-conjugated streptavidine. (A) and (B) NIH-3T3 cells transfected with Fas antigen: (A), positive control; (B), negative control. (C) Hippocampal neurons (\times 400).

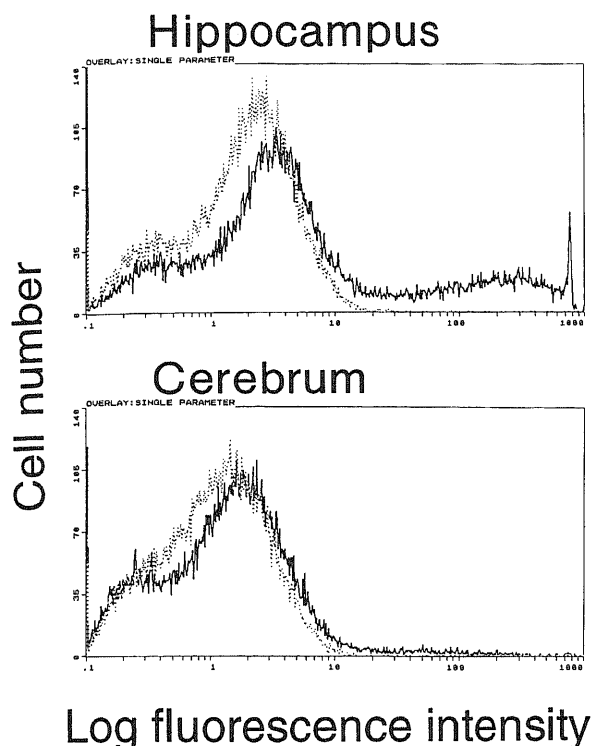


Fig. 4. Flow cytometric analysis of Fas expression in Balb/c mouse brain. Single-color histograms displaying fluorescence intensity of hippocampal neurons (upper), and cerebral neurons (lower) X-axis shows logarithmic intensity of fluorescence, while Y-axis indicates relative cell number. Dotted line, control; solid line, Fas.

り検索したところ、大脳、小脳、海馬のいずれにおいてもその発現が確認された。ただし、その発現量は陽性対照の胸腺に比し著しく少なかった。一方、陰性対照としての MRL lpr/lpr マウスにおいては脳および胸腺のいずれにも Fas mRNA は全く認められなかった (図 2)。

Ⅲ. 培養神経細胞における Fas 蛋白の発現

上記の結果より、脳内における Fas 蛋白の発現はきわめて微量であることが示唆されたため、海馬と大脳の培養神経細胞を用いて、免疫染色とフローサイトメーターによる解析を行った。この際、Fas を発現している細胞が神経細胞であることを確認するため、抗 MAP-2 抗体を用いた免疫二重染色を行うことにより神経細胞の同定を行った。免疫二重染色においては MAP-2 陽性の海馬神経細胞と大脳神経細胞の両者において Fas 陽性細胞が確認された (図 3)。フローサイトメーターによる解析では海馬細胞と大脳細胞のいずれにおいても Fas の発現が認められた。海馬細胞における Fas の発現量は大脳細胞における発現量より有意に多かった (図 4)。

考 察

個体発生や生体の生理的ならびに病的状態において生じる細胞死には壊死 (ネクロシス) とアポトーシスがある¹⁹⁾。壊死は物理的および化学的要因や虚血、補体の作用等によって障害された一群の細胞に見られる受動的細胞死であり、外部からの障害や刺激により、細胞膜の裂傷、細胞内物質の流出が続き周囲の細胞に対して害を及ぼす²⁾。これに対し、アポトーシスは生

体にとって不必要になった細胞が排除される際に誘導される生理的細胞死であり、染色体や細胞質の凝縮、細分化を伴い、最終的には食細胞に捉えられ、周りに影響を及ぼさずに消滅する。アポトーシスは核クロマチンの凝縮、核および細胞質の濃縮、断片化などの形態学的特徴や、DNA に 180–200bp の整数倍でオリゴヌクレオソーム単位の断片化がおこるといった生化学的特徴から壊死とは明確に区別される^{13,24)}。これまで、免疫系、血液系、神経系においてアポトーシスに関する多くの研究がなされ、個体発生や生体の恒常性維持にアポトーシスが重要な役割を果たすことが知られている^{9)–8)}。

1989年に Yonehara らはアポトーシス誘導活性を有する細胞表面膜タンパク質に対するモノクローナル抗体である抗 Fas 抗体を作製した⁹⁾。次いでこの抗 Fas 抗体が認識する Fas 抗原の cDNA が Itoh らによってクローニングされた¹⁰⁾。Fas 抗原は、1つの細胞膜貫通部分を有する I 型膜蛋白であり、319個のアミノ酸からなる。その細胞外部分はインスリン残基に富み TNF のレセプターや NGF の低親和性レセプターと相同性を有し、TNF/NGF レセプターファミリーに属する。Fas と I 型 TNF レセプター (p55) の細胞質部分には、68アミノ酸にわたり有意に相同性を示す領域が存在し、この領域が、両分子の細胞障害機能に重要な役割を果たすドメイン (death domain) であることがわかっている^{11,24)}。Fas cDNA をマウス T リンパ腫細胞に導入し、Fas 抗原を強く発現させると抗 Fas 抗体でアポトーシスが誘導されることから、Fas 抗原がアポトーシスのシグナルを細胞内に伝えていることが判明した¹²⁾。また細胞障害性 T 細胞から Fas リガンドの cDNA クローニングより、生体内には Fas 抗原というレセプター分子に対して Fas リガンドという作用分子が対応する形で存在していることも明らかとなった^{13)–15,25)}。

Fas 抗原の発現は、胸腺をはじめ肝臓、肺、卵巣、心臓の諸臓器で認められている¹¹⁾。特に免疫系では、細胞レベルでその発現が明らかにされ、Fas 抗原とそのリガンドは、胸腺内のネガティブセレクション、自己反応性免疫細胞の除去、末梢における活性化 T 細胞の除去などに重要な役割を担っていると推定されている^{26,27)}。自己免疫疾患やエイズなど細胞死の制御が異常である疾患においては Fas の関与について精力的な研究がなされている^{28,29)}。また慢性関節リュウマチでは、滑膜細胞で Fas 依存性のアポトーシスが生じており、疾患の活動性に Fas が何らかのかかわりがあることが推定され、治療への応用が期待されている^{30,31)}。

今回、陰性対照とした MRL lpr/lpr マウスは、リンパ節に特殊な T 細胞の蓄積や自己抗体の産生により、糸球体腎炎や全身エリテマトーデス様の自己免疫疾患をきたし、末梢 T 細胞の除去機構も異常であることが知られている^{22,32)}。このような MRL lpr/lpr マウスでは、Fas 遺伝子の第 2 イントロンにトランスポゾン (transposon) の挿入があり機能的な Fas mRNA の発現がほとんど認められないとされている²³⁾。本研究においても、この MRL lpr/lpr マウス脳組織においては、大脳、小脳、海馬のいずれにおいても、Fas 蛋白や Fas mRNA の発現は全くみられなかった。一方、Balb/c マウス脳における検索においては、免疫組織化学的検索では Fas 蛋白は海馬 CA2 と CA3 および大脳皮質において、陰性対照に比し有意に発現が確認された。さらに RT-PCR による検索では、Fas mRNA の発現は大脳、小脳、海馬のいずれにおいても確認された。したがって、

小脳に存在する蛋白はごく微量であることが推定された。

免疫組織化学的検索により脳内には Fas 蛋白が微量存在することが明らかとなったが、これを確認するために海馬と大脳の神経細胞を培養し未固定の状態で免疫染色を行った後、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターによる解析を行った。蛍光顕微鏡による観察では MAP-2 陽性の海馬神経細胞と大脳の神経細胞の両者において Fas 陽性細胞が確認された。フローサイトメーターによる解析では海馬細胞において Fas の発現が多く、大脳細胞においてはごく一部ではあるが Fas 陽性の細胞が認められた。

中枢神経系の発生過程においては通常、神経細胞は過剰に生産され、そのうち20~70%の細胞が脱落して行くと言われている³⁹⁾。その病理学的特徴はアポトーシスに類似し、自然に起こる神経細胞死 (naturally occurring neuronal death) であるとされる⁴⁰⁾。これには脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) や塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) など種々の神経栄養因子の関与が示唆されている³⁹⁾が、現在まで脳内における Fas の存在が確認されなかったため Fas の関与は報告されていない。しかし、本研究より神経細胞の一部に Fas 陽性のものがあることが確認された。特に海馬と大脳の培養神経細胞に Fas が発現することが確認されたため、この培養神経細胞の系に抗 Fas 抗体や Fas リガンドを作用させることにより、実際神経細胞にアポトーシスが誘導可能かどうかの検索が可能となった。これらにより今後、自然に起こる神経細胞死と Fas との関与についての検索が待たれる。

西岡らは慢性関節リュウマチのモデルマウスの腹腔内および関節内に抗 Fas 抗体を投与し、投与群では明らかな関節炎の消退が認められたとし、臨床応用の可能性を示唆した^{29,30)}。脳腫瘍組織においても Fas の発現とアポトーシスの頻度とが関連している¹⁸⁾ことから、抗 Fas 抗体または Fas リガンドを用いて Fas を介して細胞にアポトーシスを誘導する治療の可能性が論じられている¹⁹⁾。たとえば悪性神経腫瘍に対しては手術に加えて放射線治療、化学療法、免疫学的療法を含む集学的治療が行われているが、現時点ではその長期的治療成績はきわめて悪く、平均生存期間は8.7~20.9ヶ月であり、5年生存率は8%前後である^{36~40)}。このような悪性神経腫瘍に対しては抗 Fas 抗体を用いた新しい治療法の開発が期待される。

しかし、治療上の観点からは抗 Fas 抗体をマウスに腹腔内投与すると激症肝炎が誘発される²⁰⁾ことより、抗 Fas 抗体を全身投与することは出来ないものと思われる。したがって、もし脳腫瘍に対する臨床応用が可能であるとすれば、関節炎と同様に全身投与ではなく、局所投与が有用であると思われる。しかし、これまで正常脳では Fas の発現に関しては、詳細な検索はおこなわれておらず²¹⁾、抗 Fas 抗体や Fas リガンドの神経細胞に対する影響は不明である。神経細胞が Fas を発現することは本研究の結果からも明らかであり、神経腫瘍治療における抗 Fas 抗体や Fas リガンドの応用を考慮するならば、これらの神経細胞に対する影響に関して詳細に検討する必要がある。

結 論

Balb/c マウス脳における Fas 蛋白と mRNA の発現に関し、免疫組織化学的検索ならびに、RT-PCR 法、免疫細胞化学的検索を行い、以下のような結果を得た。

1. Fas 蛋白は、免疫組織化学的に海馬の CA2 と CA3 および大脳皮質第Ⅲ層の神経細胞に発現がみられた。
2. FasmRNA は、大脳と小脳、海馬に存在していることが確認されたが、陽性対照の胸腺に比し発現量は少なかった。
3. 陰性対照である MRL lpr/lpr マウスにおいては、大脳、小脳、海馬のいずれにおいても Fas の発現はみられなかった。
4. 以上より、生理的な神経細胞死に Fas が関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学教室山嶋哲盛助教授、立花 修助手ならびに終始直接の御指導を賜りました京都大学ウィルス研究所生体発癌教室米原 伸教授、酒巻和弘助手に心から感謝いたします。さらに、御支援と御協力を頂きました京都大学ウィルス研究所生体発癌教室ならびに金沢大学医学部脳神経外科学教室の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R.: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306 (1980).
- 2) Mclean, A. E. M., Mclean, E. & Judah, J. D.: Cellular Necrosis in the liver Induced and Modified by Drugs. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 4, 127-157 (1965).
- 3) Warning, P., Kos, F. J. & Mullbacher, A.: apoptosis or programmed cell death. *Med. Res. Rev.*, 11, 219-236 (1991).
- 4) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.: Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257 (1972).
- 5) Golstein, P., Ojcius, D. M. & Young, J. D.: Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.*, 121, 29-65 (1991).
- 6) Marrack, P., Brinster, D. R., Palmiter, R., Burkly, L., Flavell, R. H. & Kappler, J.: The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell*, 53, 627-634 (1988).
- 7) von Boehmer, H.: Positive selection of lymphocytes. *Cell*, 76, 219-228 (1994).
- 8) Webb, S., Morris, C. & Sprent, J.: Extrathymic tolerance of nature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell*, 63, 1249-1256, (1990).
- 9) Yonehara, S., Ishii, A. & Yonehara, M.: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 169, 1747-1756 (1989).
- 10) Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243 (1991).
- 11) Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N.,

- Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S.: The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.*, 148, 1274-1279 (1992).
- 12) Trauth, B. C., Klas C., Peters, A. M. J., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. & Krammer, P. H.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301-305 (1989).
- 13) Rouvier, E., Luciani, M. F. & Golstein, P.: Fas involvement in Ca (2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, 177, 195-200 (1993).
- 14) Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, 1169-1178 (1993).
- 15) Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. & Nagata, S.: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76, 969-976 (1994).
- 16) 戸田啓介, 白石哲也, 中川摂子, 木原俊彦, 鞠 硯, 田淵和雄: グリオーマにおける Fas 抗原の発現とアポトーシスの頻度. *神経免疫研究*, 7, 125-128 (1995).
- 17) Weller, M., Frei, K., Groscurth, P., Krammer, P. H., Yonekawa, Y. & Fontana, A.: Anti-Fas/ APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J. Clin. Invest.*, 94, 954-964 (1994).
- 18) Weller, M., Malipiero, U., Rensing, Ehl. A., Barr, P. J. & Fontana, A.: Fas/APO-1 gene transfer for human malignant glioma. *Cancer Res.*, 55, 2936-2944 (1995).
- 19) 白石哲也, 中川摂子, 木原俊彦, 鞠 硯, 田淵和雄: アポトーシスの分子機構と神経疾患. *脳神経外科*, 23, 563-574 (1995).
- 20) Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S.: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-809 (1993).
- 21) Leithauser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H. & Moller, P.: Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* 69, 415-429 (1993).
- 22) Choen, P. L. & Eisenberg, R. A.: Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Ann. Rev. Immunol.*, 9, 243-269 (1991).
- 23) Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S.: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356, 314-317 (1992).
- 24) Itoh, N. & Nagata, S.: A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-10937 (1993).
- 25) Suda, T. & Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873-879 (1994).
- 26) Ogasawara, J., Suda, T. & Nagata, S.: Selective apoptosis of CD4+CD8+thymocytes by the anti-Fas antibody. *J. Exp. Med.*, 181, 485-491 (1995).
- 27) Nishimura, Y., Ishii, A., Kobayashi, Y., Yamasaki, Y. & Yonehara, S.: Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.*, 154, 4395-4403 (1995).
- 28) Gougeon, M. L. & Montagnier, L.: Apoptosis in AID. *Science*, 260, 1269-1270 (1993).
- 29) Kobayashi, N., Hamamoto, Y., Yamamoto, N., Ishii, A., Yonehara, M. & Yonehara, S.: Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 9620-9624 (1990).
- 30) Nakajima, T., Aono, H., Hasunuma, T., Yamamoto, K., Shirai, T., Hirohata, K. & Nishioka, K.: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis. Rheum.*, 38, 485-491 (1995).
- 31) 西岡久寿樹, 米原 伸: Fas 依存性 Apoptosis の誘導による新しい RA の治療戦略. *リウマチ*, 35S, W16-6 (1995).
- 32) Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. & Nagata, S.: Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 1756-1760 (1993).
- 33) Jacobson, M.: *Developmental Neurobiology*, 3rd Ed., p311-358, Plenum Press, New York, 1991.
- 34) Clark, P. G. H.: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, 181, 195-213 (1990).
- 35) Segal, R. A., Takahashi, H. & McKay, R. D. G.: Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron*, 9, 1041-1052 (1992).
- 36) 生塩之敬: グリオーマの化学療法. *Neurosurgeons*, 7, 9-18 (1988).
- 37) Kornblith, P. L. & Walker, M.: chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurosurg.*, 68, 1-17 (1988).
- 38) Anderson, J., Christensen, L. & Kongsholm, H.: Phase II trial of prednimustine in glioblastoma multiforme. *Cancer Treat. Rep.*, 68, 795-797 (1984).
- 39) Mortimer, J. E., Crowley J., Eyre H., Weiden, P., Eltringham, J. & Stuckey, W. J.: A phase II randomized study comparing sequential and combined intraarterial cisplatin and radiation therapy in primary brain tumors. *Cancer*, 69, 1220-1223 (1992).
- 40) 脳腫瘍全国統計委員会, 日本病理学会編: 脳腫瘍取扱い規約, 1, 45-58 (1995).

Expression of Fas Antigen in Balb/c Mouse Neurons Which Mediates Apoptosis Cheho Park, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 287—294 (1996)

Key words anti-Fas antibody, apoptosis, Balb/c mouse, Fas antigen, neuron

Abstract

Fas antigen (CD95) is a cell-surface receptor protein which mediates apoptosis. It is well known that Fas antigen is expressed in the mouse thymus, lung, heart, liver, and ovary. Although human glioma cells have been reported to express Fas antigen, it still remains unknown whether neurons express Fas, and whether anti-Fas antibody has any effect on neurons. The expression of Fas and its mRNA were studied in the Balb/c mouse brain. By RT-PCR, Fas mRNA was expressed in the cerebrum, cerebellum, and hippocampus. By immunohistochemistry, Fas antigen was expressed in the CA2 and CA3 sectors of the hippocampus and cerebrum, whereas it was negative in cerebellum. In cultured hippocampal and cerebral neurons, Fas antigen was confirmed using immunofluorescence and flowcytometer. Fas expression was seen in hippocampal neurons and also in cerebral neurons. These results indicate that there exist neurons which express Fas and that Fas might play some role in neuronal cell death.